第8卷 增刊
1987年11月

动物学研究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol.8, Sup.
Nov., 1987

烙铁头蛇毒血小板聚集素对大鼠血小板聚集作用及药物影响

徐理纳 王建平 刘秦越
（中国医学科学院药物研究所 北京）

摘 要

采用比浊法观察烙铁头 *Trimeresurus mucrosquamatus* 蛇毒血小板聚集素（TMVA）诱导大鼠血小板聚集。TMVA在0.5μg/ml即可引起血小板聚集，20—50μg/ml聚集率可高达80%左右，均为不可逆聚集。对低浓度（5μg/ml）TMVA诱导的血小板聚集，阿魏酸钠和前列腺素E_1没有明显影响，前列环素（PGI_2）可增强其聚集活性；对高浓度（20μg/ml）TMVA诱导的聚集，阿魏酸钠和前列腺素E_1可拮抗其聚集作用，PGI_2有抑制聚集趋势。静注阿魏酸钠（236mg/kg）不影响以TMVA和ADP诱导的血小板聚集，对胶原诱导的聚集有显著抑制作用。川芎嗪（1—4mM）对TMVA诱导的聚集无明显影响。

关键词 烙铁头蛇毒 血小板聚集 大鼠 阿魏酸钠 前列腺素E_1

烙铁头蛇毒血小板聚集素可诱导人和多种动物(狗、家兔、豚鼠)血小板聚集，并可通过血小板花生四烯酸(AA)代谢途径生成血栓素A_2(TXA_2)，但其活化血小板机理可能通过不依赖血小板AA代谢途径(阮长耿等，1983)。前列环素(PGI_2)和前列腺素E_1(PGEl)对多种诱导剂所引起的血小板聚集均有阻抑作用(Weiss，1983)。阿魏酸钠和川芎嗪可抑制血小板TXA_2的生成(徐理纳等，1984；蔺桂芳等，1980)。我们观察了TMVA对大鼠血小板的聚集作用及上述几种药物对TMVA诱导的大鼠血小板聚集性的影响。

材 料 和 方 法

(一) 材料 实验用150克以上的雄性大鼠。TMVA系中国科学院昆明动物研究所提供，为TMVA Tris缓冲液经真空干燥的粉末，临用时以蒸馏水溶解和稀释。可溶

韩一虹同志参加部分预试实验，特此致谢。

性胶原为Hormone厂产品，ADP钠盐购自Sigma厂，PGI_2钠盐为美国Wellcome厂赠送，PGE_1为白求恩医科大学生产，纯度88%。阿魏酸钠由本所植化室提供，盐酸川芎嗪为北京制药厂产品。

（二）方法 将大鼠以戊巴比妥钠麻醉，用硅化注射器从腹主动脉取血。血液以0.11*M*枸橼酸钠按9:1(V/V)抗凝，离心10分钟（1000转/分），取出的上层液即为富含血小板血浆（PRP）。其余血浆继续离心10分钟（3000转/分），分离出的上清液即为贫血小板血浆（PPP）。一般实验中PRP的血小板数调节在45—50万/mm^3。

按Born氏比浊法测定血小板聚集性。采用日本PAT—4A型NIKO四导血小板聚集仪进行实验。每次取PRP 0.2ml置于比浊管中，加药液（一般为10μl）后于37°C温孵2分钟，然后加诱导剂（10μl），记录加诱导剂后5分钟的聚集曲线，并计算最大聚集率（%）。

结 果

（一）TMVA诱导血小板聚集作用

将2—4只大鼠PRP混合，每次取0.2ml PRP，加不同浓度的TMVA，不同终浓度TMVA（0.125—50μg/ml)的血小板聚集率见表1。由表1可见，TMVA在0.5μg/ml即可引起血小板聚集（14%），10μg/ml时血小板聚集率为60%，20—50μg/ml聚集率高达80%左右，均为不可逆聚集。

表1 不同浓度TMVA对大鼠血小板聚集性的影响（$\overline{X}\pm SD$, n = 5）

Table. 1 Effect of TMVA on rat platelet aggregation ($\overline{X}\pm SD$, n = 5)

TMVA (μg/ml)	% Aggregation	TMVA (μg/ml)	% Aggregation
0.125	3 ± 1	5	35 ± 7
0.25	6 ± 3	10	60 ± 21
0.5	14 ± 4	20	79 ± 5
1.0	21 ± 6	25	79 ± 4
2.5	28 ± 6	50	80 ± 4

（二）阿魏酸钠和盐酸川芎嗪对TMVA诱导血小板聚集的影响

1.体外给药 采用低浓度（5μg/ml）和高浓度（20μg/ml）TMVA诱导血小板聚集，观察阿魏酸钠和川芎嗪的作用，对照管加10μl生理盐水或5μl pH 3—4蒸馏水（川芎嗪对照液）。为与TMVA作对比研究，同时也观察两药对胶原诱导血小板聚集的影响。

实验结果如表2所示，阿魏酸钠对低浓度TMVA诱导聚集作用无影响，可是，阿魏酸钠（4mM）对高浓度TMVA诱导的聚集反而有显著抑制作用。与上述结果不同，阿魏酸钠对胶原诱导聚集的阻抑作用较为明显，并且，对低浓度胶原作用的抑制强于对高浓度胶原作用的抑制。川芎嗪不影响TMVA诱导的聚集，4mM可抑制胶原诱导的聚集反应。

表 2　阿魏酸钠和盐酸川芎嗪体外给药对 TMVA 诱导大鼠血小板聚集性的影响（$\bar{X}\pm SD$，n = 3）

Table. 2 Effects of Sodium Ferulate and tetramethglpyrazine on rat platelet aggregation induced by TMVA

Inducer		Sodiam Feralate			Tetrmethglpyrazine		
		Concentrat ion (mM)	Aggregation (%)	valud	Concentrat ion (mM)	Aggregation (%)	value
TMVA	5μg/ml	Control	35±9		Control	39±3	
		1	33±4	>0.05	1	37±3	>0.05
		4	33±3		4	39±3	>0.05
	20μg/ml	Control	85±7		Control	85±10	
		1	79±6	>0.05	1	81±8	>0.05
		4	52±21	<0.05	4	76±4	>0.05
collagen	20μg/ml	Control	78±6		Control	71±9	
		1	49±8	<0.01	1	65±11	>0.05
		4	0	<0.01	4	15±26	<0.05
	50μg/ml	Control	76±4				
		1	49±24	>0.05			
		4	24±13	<0.05			

表 3　阿魏酸钠（236mg/kg iv）对TMVA诱导的大鼠的血小板聚集的影响（$\bar{X}\pm SD$，n = 5—6）

Table. 3 Effects of sodium Ferulate (S. F.) in vivo (236 mg/kg iv) on rat plateler aggregation induced by TMVA ($\bar{X}\pm SD$, n = 5—6)

Inducer fiual Concentration	Drug	Aggregation %	inhibition %	P value
TMVA (5 μg/ml)	Control	34±5	-10%	>0.05
	S. F.	37±10		
Collagen (50~75μg/ml	Control	67±10	47%	<0.01
	S. F.	35±20		
ADP (5 μg/ml)	Control	77±13	9%	>0.05
	S. F.	70±12		

2.体内给药　给大鼠静脉注射阿魏酸钠236mg/kg后即刻从腹主动脉取血，制备富含血小板血浆。观察胶原和ADP、TMVA诱导血小板聚集性变化。阿魏酸钠对低浓度TMVA和ADP诱导的聚集没有影响，对胶原诱导聚集有明显抑制作用（表3）。

（三）PGE_1和PGI_2对TMVA诱导的血小板聚集性的影响

PGE_1对TMVA诱导聚集的影响与阿魏酸钠相似，即对低浓度TMVA诱导聚集无明显影响，但可抑制高浓度TMVA诱导的聚集。

表4　PGE_1对TMVA诱导的大鼠血小板聚集性的影响（$\bar{X}\pm SD$, n＝3）

Table. 4 Effects of PGE_1 on rat platelet aggregation induced by TMVA

Inducer		PGE_1 Concentration (μM)	Aggregation (%)	P valae
TMVA	5μg/ml	Control	41±2	
		0.05	39±1	>0.05
		0.5	45±5	>0.05
	20μg/ml	Control	85±2	
		0.5	38±3	<0.01
Collagen	20μg/ml	Control	55±18	
		0.05	0	<0.01
		0.5	0	<0.01

PGI_2 10ng/ml和25ng/ml对ADP（5μg/ml）和胶原（25μg/ml、50μg/ml）均有显著抑制作用，对低浓度TMVA有促进聚集作用，PGI_2 25ng/ml可使TMVA（5μg/ml）诱导的血小板聚集率增加45%，对高浓度TMVA诱导聚集有抑制趋势。

讨　　论

TMVA可诱导血小板聚集，同时伴有血小板TXA_2的生成。阿司匹林可阻断TMVA诱导家兔血小板TXA_2样物质的形成，但并不影响TMVA的血小板聚集作用，提示TMVA可能通过不依赖于TXA_2或AA代谢途径而诱导血小板聚集（阮长耿，1983）。

据研究（徐理纳等，1984），阿魏酸钠在终浓度0.25—1.0mg/ml（相当于1.2—4.6mM）时对胶原诱导的血小板TXA_2样物质的活性有明显抑制作用。本文中阿魏酸钠4mM可抑制高浓度（20μg/ml）TMVA诱导的大鼠血小板聚集。从而推测，TMVA（20μg/ml）诱导的大鼠血小板聚集可能通过血小板AA代谢。

阿魏酸钠、川芎嗪、PGE_1和PGI_2对低浓度（5μg/ml）TMVA诱导的血小板聚集都无抑制作用，此浓度TMVA可能系通过不依赖于AA代谢途径而活化血小板。

表 5　PGI_2对TMVA 诱导的大鼠血小板聚集的影响（$\overline{X}\pm SD$，$n=3$）

Table. 5　Effects of PGI_2 on rat platelet aggregation induced by TMVA

Inducer		PGI_2			Inducer		PGI_2			Inducer		PGI_2		
		Concentration ng/ml	Aggregation %	P value			Concentration ng/ml	Aggregation %	P value			Concentration ng/ml	Aggregation %	Pvalue
		Control	31±3				Control	58±8				Control	62±2	
	5 μg/ml	10	36±2	>0.05		20μg/ml	10	0	<0.01	ADP		10	46±5	<0.01
		25	45±8	<0.05			25	0	<0.01	5 μg/ml		25	22±2	<0.01
TMVA					Collagen									
		Control	78±5				Control	68±0						
	20μg/ml	10	71±6	>0.05		50μg/ml	10	61±1	<0.05					
		25	58±25	>0.05			25	1±1	<0.01					

PGE_1和PGI_2通过激活腺苷酸环化酶，升高血小板c-AMP水平而抑制血小板聚集（Weiss，1983））。血小板c-AMP水平升高可抑制血小板聚集，一方面通过对磷脂酶和环氧酶的抑制而阻断TXA_2的生成；另方面可激活蛋白激酶，使蛋白磷酸化，促进血小板致密管道系统对胞浆内Ca^{++}的再摄取(LassLo & Quintana 1984)。PGE_1和PGI_2对高浓度（20μg/ml）TMVA诱导的血小板聚集有抑制作用或抑制趋势，可能与其激活腺苷酸环化酶，增加血小板内c-AMP含量有关。至于PGI_2对低浓度（5 μg/ml）TMVA诱导聚集不仅没有抑制作用，反而增加其聚集活性，目前尚不能解释。

川芎嗪1.5—6 mM对TMVA（10μg/ml）诱导的人血小板聚集和5—HT释放有明显抑制作用(阮长耿，1986)，本文结果川芎嗪1—4 mM不抑制TMVA(5—20μg/ml)诱导的大鼠血小板聚集。上述的不同结果可能是由于种属不同等原因所致。

本文研究结果也说明，与胶原和ADP比较，TMVA诱导的血小板聚集不易为血小板抑制剂所阻抑。若能阐明TMVA活化血小板的机理，则TMVA可作为一个新诱导剂应用于抗血小板药的机理研究。

参 考 文 献

王婉瑜等　1983　烙铁头蛇毒的研究（Ⅰ）柱层析分离及酶活性与生物活性测定。动物学研究　4(4):327

阮长耿等　1983　烙铁头蛇毒对血小板的活化作用。动物学研究　4(3):245

徐理纳等　1984　阿魏酸钠抗血小板作用机理研究——对TXA_2/PGI_2平衡的影响。中国医学科学院学报　6:414

蔺桂芬等　1980　血小板恶A_2的药理学调节Ⅰ，川芎嗪对血小板恶A_2的生物合成及其生物活性的影响。北京第二医学院学报　(1):5

Lasslo A, Quintana RP 1984 Interaction dynamics of blood platelets with medicinal agents and other chemical entities. In: Lasslo A (ed.) Blood platelet function and medicinal chemistry. Elsevier, Amterndam pp. 229—314

Weiss HJ 1983 Antiplatelet drugs, pharmacologic aspects. In Weiss HJ (ed.) Platelets, pathophysiology and antiplatelet drug therapy. Alan R Liss Inc. New York pp. 45—107

THE EFFECTS OF SODIUM FERULATE, TETRAMETHYLPYRAZINE, PROSTAGLANDIN E_1 AND PROSTACYCLIN ON PLATELET AGGREGATION INDUCED BY THE VENOM OF *TRIMERESURUS MUCROSQUAMATUS* IN RATS

Xu Lina　Wang Jianping　Liu Qinyuc

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences)

The platelet aggregation induced by the venom of *Trimeresurus macrosqamatus* (TMVA) was estimated by turbidimetric method in rats. TMVA at the concentration of 0.5ug/ml elicited platelet aggregation. The ratio of aggregation may be 80% more or less when TMVA was used at the concentration of 20—50 ug/ml. All the aggregations induced by TMVA were irreversible.

Sodium ferulate and PGE_1 showed no significant effect on the aggregation induced by the lower concentration (5 ug/ml) of TMVA, while prostacyclin seemed to potentiate the aggregation. Both sodium ferulate and PGE_1 inhibited the aggregation induced by the higher concentration (20ug/ml) of TMVA, while prostacyclin showed a tendency to inhibit the aggregation. Tetramethylpyrazine (1—4 mM) showed no significant effect on the platelet aggregation induced by TMVA. After the intravenous injection of sodium ferulate to rats at a dose of 236 mg/kg, the platelet aggregation induced by collagen was significantly suppressed, however, the platelet aggregation induced by TMVA or ADP showed no obvious change.

Key words　*Trimeresurus mucrosquamatus* venom　Platelet aggregation　Rat　Sodium ferulate　Prostaglandin E_1